

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-009973

(43)Date of publication of application : 14.01.1997

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
 C07H 21/04
 // C12N 9/80
 C12N 9/88
 (C12N 15/09
 C12R 1:01)
 (C12N 9/80
 C12R 1:01)
 (C12N 9/88
 C12R 1:01)

(21)Application number : 07-184934

(71)Applicant : CHISSO CORP

(22)Date of filing : 27.06.1995

(72)Inventor : AOYAMA SHIGEYUKI
 YOSHIDA NAOYUKI

(54) NITRILE HYDRATASE GENE AND AMIDASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a new nitrile hydratase gene having a specific base sequence, coding for nitrile hydratase stemmed from Rhodococcus bacteria, and useful for e.g. producing an enzyme capable of giving amides or carboxylic acids useful as raw materials for medicines, liquid crystal material, starting from nitriles.

CONSTITUTION: The new gene has a sequence of the formula and codes for a nitrile hydratase stemmed from Rhodococcus bacteria [e.g. Rhodococcus rhodochrous IFO15564 strain], therefore being useful for e.g. producing through the genetic engineering technology a nitrile hydratase capable of giving amides or carboxylic acids useful, as raw materials for medicines, liquid crystal material, etc., starting from nitrile compounds. This enzyme gene is obtained by the following process: the above strain is cultured and the chromosome DNA therein is extracted, and using the DNA, a chromosome library is constructed, and then screened using a nitrile hydratase gene fragment as a probe, followed by recovering the aimed DNA from a positive strain.

1. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 2. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 3. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 4. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 5. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 6. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 7. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 8. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 9. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 10. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 11. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 12. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 13. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 14. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 15. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 16. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 17. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 18. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 19. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 20. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 21. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 22. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 23. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 24. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 25. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 26. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 27. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 28. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 29. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 30. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 31. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 32. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 33. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 34. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 35. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 36. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 37. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 38. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 39. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 40. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 41. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 42. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 43. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 44. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 45. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 46. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 47. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 48. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 49. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 50. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 51. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 52. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 53. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 54. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 55. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 56. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 57. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 58. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 59. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 60. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 61. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 62. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 63. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 64. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 65. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 66. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 67. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 68. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 69. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 70. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 71. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 72. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 73. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 74. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 75. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 76. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 77. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 78. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 79. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 80. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 81. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 82. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 83. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 84. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 85. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 86. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 87. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 88. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 89. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 90. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 91. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 92. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 93. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 94. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 95. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 96. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 97. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 98. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 99. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM
 100. A NITRILE HYDRATASE GENE DERIVED FROM RHODOCOCOCCUS BACTERIUM

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-9973

(43) 公開日 平成9年(1997)1月14日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
// C 1 2 N 9/80			C 1 2 N 9/80	A
9/88			9/88	
(C 1 2 N 15/09	Z N A			

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-184934

(22) 出願日 平成7年(1995)6月27日

(71) 出願人 000002071

チッソ株式会社

大阪府大阪市北区中之島3丁目6番32号

(72) 発明者 青山 茂之

神奈川県横浜市金沢区乙船町10番2号

(72) 発明者 吉田 尚之

千葉県市原市村上1750

(74) 代理人 弁理士 野中 克彦

(54) 【発明の名称】 ロードコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ遺伝子

(57) 【要約】

【目的】 ロードコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子とアミダーゼ遺伝子およびそれらのDNA配列を提供すること。

【構成】 ロードコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ遺伝子。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1で示されるロードコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子。

【請求項2】 配列表の配列番号2で示されるロードコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子。

【請求項3】 ロードコッカス属細菌がロードコッカスロードクラス (*Rhodococcus rhodochrous*) IFO15564株である請求項1記載のニトリルヒドラターゼ遺伝子。

【請求項4】 ロードコッカス属細菌がロードコッカスロードクラス (*Rhodococcus rhodochrous*) IFO15564株である請求項2記載のアミダーゼ遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はロードコッカス属細菌由来のニトリル分解系酵素であるニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ遺伝子のDNA配列に関する。

【0002】

【従来の技術】 ニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼはそれぞれニトリル化合物をアミドに、アミド化合物をカルボン酸に変換する反応を触媒する。本発明で得られるニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼを用いることによってニトリル化合物から、医薬原料や液晶材料等に有用なアミドまたはカルボン酸を得ることができる。ニトリル化合物を温和な条件下でそれぞれ相当するアミドまたは酸に変換する方法が生体触媒の利用によって開発され、このような触媒能をもつ微生物が報告されている（特公昭56-17918号公報、特公昭59-37951号公報、特公昭61-162193号公報、特公昭61-21519号公報、特公昭64-86889号公報、特公平4-197189号公報、EP0444640など）。

【0003】 また、これらの微生物からはニトリルヒドラターゼやアミダーゼあるいはニトリラーゼが精製され、さらにはこれらの酵素の遺伝子工学的利用を計るため、その遺伝子が単離され一次構造が決定されている。ニトリルヒドラターゼ遺伝子については、例えばロードコッカス属細菌由来の遺伝子が特開平2-119778号公報やEP0445646において、シュードモナス属細菌由来の遺伝子が特開平3-251184号公報において、リゾビウム属細菌由来の遺伝子が特開平6-25296号公報や特開平6-303971号公報において、またアミダーゼ遺伝子については、例えばブレバクテリウム属細菌とロードコッカス属細菌由来の遺伝子がEP0433117に開示されている。さらにロードコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ両遺伝子を含む組換え体プラスミドに関する発明が特開平5-68556号公報で開示されている。

2

【0004】 近年、このような微生物がもつニトリル化合物の変換能を応用する試みがなされている。特に付加価値の高い光学活性化合物の製造に利用するために、微生物のスクリーニングがおこなわれている。例えば、特開平2-84198号公報には光学活性な α -置換有機酸の製造に用いる微生物について、特開平4-341185号公報には光学活性な2-ヒドロキシカルボン酸の製造に用いる微生物について、EP0433117には光学活性なケトプロフェンの製造に用いる微生物についてそれぞれ開示されている。また例えば、MayauxらはS(+)-2-フェニルプロピオン酸の製造に用いるロードコッカス属細菌のアミダーゼ遺伝子のDNA配列の報告をおこなっている (Mayaux, J-F. et al., J. Bacteriol., 173, 6694, (1991))

【0005】 このような微生物のうち、ロードコッカスロードクラス (*Rhodococcus rhodochrous*) IFO15564株は様々なラセミ体やプロキラルなニトリル化合物に対し鏡像体選択的加水分解能をもつことが報告されていて、今後、光学活性化合物の製造のための利用の拡大が予想される (Takeya, H. et al., Tetrahedron Lett., 32, 1343, (1991))。例えば、ロードコッカスロードクラス IFO15564株の培養菌体を用いた光学活性化合物の製造例として、3位に置換基をもつグルタルニトリル型基質を光学活性なシアノカルボン酸に変換する反応 (Takeya, H. et al., Chem. Lett., 1823, (1991)) およびプロキラルなジ置換マロニトリルを強誘電液晶の原料に有用な光学活性アミドカルボン酸に変換する反応 (Yokoyama, M. et al., Tetrahedron: Asymmetry, 4, 1080, (1993)) 等があげられる。本菌のもつこのような特性を工業的に利用するためには、反応を触媒する酵素のより一層の生産性向上、熱や有機溶媒中での安定性、あるいは特徴ある基質特異性や位置特異性などが望まれる。しかし、本菌のニトリルヒドラターゼやアミダーゼあるいは同様の特性を示す他の生物由来の酵素については、その構造が明らかにされていない。従って、現在多くの研究者が検討している遺伝子工学的手法やタンパク質工学的手法を用いた酵素の効率的な生産や改変による改良をおこなうことができなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的はロードコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼを、遺伝子工学的手法を用いて効率良く生産したり、タンパク質工学的手法を用いて改良するために必要なロードコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子、アミダーゼ遺伝子およびそれらのDNA配列を提供することにある。

【課題を解決するための手段】 本発明は、下記(1)～(4)の構成を有する。

50

3

(1) 配列表の配列番号1で示されるロードコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子。

(2) 配列表の配列番号2で示されるロードコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子。

(3) ロードコッカス属細菌がロードコッカス ロードクラス (*Rhodococcus rhodochrous*) IFO15564株である前記第1項記載の遺伝子。

(4) ロードコッカス属細菌がロードコッカス ロードクラス (*Rhodococcus rhodochrous*) IFO15564株である前記第2項記載の遺伝子。

【0007】以下、本発明を詳細に説明する。ロードコッカス ロードクラス (*Rhodococcus rhodochrous*) IFO15564株染色体DNAは、例えばSaitoらの方法 (Saito, H. & Miura, K., Biochim. Biophys. Acta., 72, 619, (1963)) を用いて調製することができる。遺伝子のクローニングに用いる染色体DNAライブラリーは、例えばpUC19プラスミドベクターやλEMBL3ファージベクターなどを用いて作製することができる。ニトリルヒドラターゼ遺伝子とアミダーゼ遺伝子のクローニングは、例えばSaikiらのPolymerase Chain Reaction (PCR) 法 (Saiki, R. K. et al., Science, 230, 1350 (1985)) を用いておこなうことができる。この時、使用するPCR用プライマーは、既知ニトリルヒドラターゼ遺伝子あるいは既知アミダーゼ遺伝子のアミノ酸配列を比較検討することにより、よく保存された部位あるいは保存が充分期待される部位などから選び出さなければならない。ロードコッカス菌では *R. sp.* 株 (Mayaux, J.-F. et al., J. Bacteriol., 173, 6694, (1991))、*R. sp.* N-774株 (Hashimoto, Y. et al., Biochim. Biophys. Acta., 1088, 225, (1991))、*R. erythropolis* JCM6823株 (Durban, R. et al., Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1323, (1993)) あるいは *R. rhodochrous* J1 (Kobayashi, M. et al., Eur. J. Biochem., 217, 327, (1993)) 株などについて配列が明らかにされている。また、*R. sp.* 株、*R. sp.* N-774株あるいは *R. erythropolis* JCM6823株などの解析から、これらのアミダーゼ遺伝子下流にニトリルヒドラターゼ遺伝子が存在することが報告されている。

【0008】そしてPCR法で得たニトリルヒドラターゼ遺伝子あるいはアミダーゼ遺伝子あるいはその両遺伝子の一部を含むDNA断片をスクリーニング用プローブとして使用することにより、*Rhodococcus rhodochrous* (*R. rhodochrous*) IFO15564株の染色体DNAライブラリーからニトリルヒドラターゼ遺伝子とアミダーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを得ることができる。この組換え体D

4

NAをサブクローン化することによって、小断片化することができる。そして、ニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ遺伝子さらにはそれらの発現に必要な領域のDNA配列は、Sangerらによるdideoxy法 (Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463, (1977)) など公知の手法を用いて決定することができる。ここで得られたニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ遺伝子さらにはそれらの発現に必要な領域のDNA配列を含む組換えベクターで形質転換された形質転換微生物は次の通り工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

JM109 (pCNH-SE) FERM P-14901号

【0009】

【実施例】以下実施例にて本発明を具体的に説明する。染色体DNAの調製

R. rhodochrous IFO15564株を下記の培地で30℃にて2日間培養した。

培地	グルコース	1.5%
	リン酸水素一カリウム	0.05%
	リン酸水素二カリウム	0.05%
	硫酸マグネシウム	0.05%
	イーストエキストラ	0.1%
	ε-カプロラクタム	0.5%

【0010】培養後の菌体を集菌し、氷冷した0.1Mのカルシウム溶液にこの菌体を懸濁し30分間氷中に放置した。この懸濁液より再び菌体を集菌した後、この菌体を10mlの緩衝液 (50mMトリス-塩酸緩衝液 (pH8.0)、50mMEDTA) に懸濁した。この懸濁液に1mgのリゾチムを加え1時間室温に放置した後、さらに1mgのアクロモベプチダーゼを加え30分間室温に放置した。この溶液に0.5% SDS存在下、100μg/mlの濃度となるようにプロテナーゼK (メルク社製) を加え、一晚55℃でゆるやかに振盪した。この溶液をフェノール抽出、エタノール沈殿することによって染色体DNAを調製した。

【0011】染色体ライブラリーの作製

得られた染色体DNA20μgに対し制限酵素Sau3Aを用いて部分消化をおこなった。即ち、染色体DNAを4μgづつ5本のチューブにとり、100μlの反応容量中で、制限酵素Sau3AI (日本ジーン、2~8U/μl) を下記の条件で添加し37℃で反応させた後、終濃度20mMとなるようEDTAを加え反応を停止させた。

Sau3AI添加量	0.1μl	反応時間2分
	0.5μl	2分
	1μl	1分
	1μl	4分
	1μl	7分

50 このようにして調製した染色体DNAの部分消化断片を

5

エタノール沈殿により全量回収した後、この染色体DNAの部分消化断片を、ベックマンTLS-55ローターを用いて26,000rpm、18時間、15℃の条件で10~40%W/Wのショ糖密度勾配遠心法により展開した。10~20kbのDNA断片を含む分画をエタノール沈殿にて回収し、10μlのTE溶液に溶解させた。この試料の9μlと1μgのBamHI消化λEMBL3ベクター（ストラタジーン、λEMBL3/BamHI Vector Kit）とを350UのT4 DNAリガーゼ（宝酒造社製）を用いて15μlの計でライゲーションした。この反応液4μlについてGigapack II Gold（ストラタジーン社製）を用いてin vitroパッケージングをおこなった。このパッケージング溶液の効率を知るために、大腸菌P2392株を用いてタイター（titre）測定をおこなった。その結果、このλEMBL3染色体DNAライブラリー*

反応液組成：

R. <i>rhodochrous</i> IFO15564染色体DNA	1 μg
AMN-1プライマー	100 pmol
AMR-1プライマー	100 pmol
dNTP溶液	各1 mM
10x反応バッファー	10 μl
Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）	2.5 Unit
	計100 μl

反応条件：

熱変性	94℃、45秒
アニーリング	60℃、60秒
DNA合成	72℃、60秒
サイクル数	40回

このようにして得た増幅DNA断片のうち、予想される約0.7kbの断片を回収し、T4 DNAポリメラーゼにより平滑末端化とT4ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化処理をおこなった。このDNA断片をpUC118のSmaI部位と連結した。この組換え体プラスミドの導入DNA断片について、dideoxy法によりDNA配列を決定し、翻訳されたアミノ酸配列が既知のアミダーゼと相同性があることを確認した。アミダーゼ遺伝子の一部が挿入されていることが確認された組換え体プラスミドに対し、前述のプライマーAMN-1、AMR-1を用いて再び同様の条件によるPCRをおこない、その導入された約0.7kb DNA断片の増幅をおこなった。このDNA断片をBcaBESTラベリングキット（宝酒造）の方法に従って[³²P]により標識をおこなった。この標識DNA断片をスクリーニング用のプローブとして用いた。

【0015】ニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ遺伝子のクローニング

前記ライセート液の約10⁵ pfu分のファージ溶液と、28℃で一晩培養しO.D.₅₅₀=0.5となるように10mMのMgSO₄で調製したP2392株20

6

＊のサイズは約55万個の独立クローンが存在するサイズであった。このライブラリーの増幅ライブラリーを作製するために、ライブラリーをブレーティングした後、プレートライセート法によりプレートライセート液を調製した。このライセート液は1x10⁶ pfu/μlであった。

【0012】ニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ遺伝子のクローニング用プローブの作製

既知のR. *sp.* N-774株、R. *erythropolis* JCM6823株およびR. *rhodochrous* J1株のアミダーゼ遺伝子を比較検討し、図1のアミノ酸に対応するDNA配列からなるPCR用混合プライマーを合成した。

【0013】

【図1】

【0014】PCR法は以下の反応条件でおこなった。

0μlとを混合した。この溶液を37℃、15分間インキュベートした後、0.7%アガロースを3ml加えた。1.5%アガロースLB培地（10%バクトトリプトン（ディフコ）、5%イーストエキストラ（ディフコ）、5%NaCl）のプレート（9cm直径）に、プレートあたり10000~15000ブラークとなるようにこの溶液を播き、ブラークのできたプレートを作製した。このプレートに対し、前述した[³²P]標識プローブを用いてManiatisらのMolecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1982))記載の方法に従い65℃でブラークハイブリダイゼーションをおこなった。その結果、組換えファージブラーク1000個あたり1~2個の陽性シグナルを得た。陽性シグナルを示す組換えファージに対し2次スクリーニングをおこない、最終的に4個の組換えファージを純化し、ManiatisらのMolecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1982))記載の方法に従ってファージDNAを調製した。この調製したファージDNAを種々の制限酵素を加えて消化し、サザンブロッティング解析（Southern, E.M., J. Mol. Biol., 98, 503 (1975))をおこなった。そして、標識プローブによって検出された約9kbのEcoRI消化DNA断片を有すファージクローンについて、さらに詳細な制限酵素による解析をおこなった。その結果このファージクローンには、約15kbのDNA断片が挿入されていることが判明した。その制限酵素地図を図2に示した。さらに、この挿入された約15kbのD

NA断片についてサザン解析をおこない、その結果、EcoRI-SacI消化約6kb DNA断片がプローブによって検出されたので、このDNA断片をpUC19のSacI-EcoRI部位に導入した。得られた組換え体プラスミドをpCNH-SEとした。

【0016】

【図2】

【0017】pCNH-SEのDNA配列の決定

pCNH-SEのDNA配列の決定をBcaBESTシーケンシングキット（宝酒造社製）の方法に従っておこなった。その結果、配列表の配列番号3に示すようなオープンリーディングフレームの存在が確認された。521アミノ酸をコードするオープンリーディングフレームがアミダーゼ遺伝子をコードするDNA配列であること、207アミノ酸をコードするオープンリーディングフレームがニトリルヒドラーターゼのαサブユニット遺伝子をコードするDNA配列であること、212アミノ酸をコードするオープンリーディングフレームがニトリルヒドラーターゼのβサブユニット遺伝子をコードするDNA配列であることがわかった。さらに、ニトリルヒドラーターゼのβサブユニットをコードしているオープンリーディングフレームの下流にHashimotoら（Hashimoto, Y. et al., Biosci. Biotech. Biochem., 58, 1859, (1994)）によって示されたニトリルヒドラーターゼの活性発現に関与する因子をコードする399アミノ酸よりなるオープンリーディングフレームが存在した。

*【0018】

【発明の効果】本発明は光学活性の製造に利用可能なロードコッカス属細菌のニトリルヒドラーターゼおよびアミダーゼ遺伝子のDNA配列を提供するものである。これらのDNA配列は、ニトリルヒドラーターゼ、アミダーゼの遺伝子工学的手法を用いた効率的生産やタンパク質工学的手法を用いた酵素の改良などに利用できる。このようにして得た酵素は有用化合物の工業的生産への応用に期待できる。

10 【0019】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1566

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ロードコッカス ロードクラス（*Rhodococcus rhodochrous*）

株名：IFO15564

配列の特徴

配列の産物：アミダーゼ

存在位置：1..1566

特徴を決定した方法：E

*

1	ATG GCG ACA ATC CGA CCT GAC GAC AAT GCA ATA GAC ACC GCC GCA	45
	Met Ala Thr Ile Arg Pro Asp Asp Asn Ala Ile Asp Thr Ala Ala	
	10	
46	AAG CAT TAC GGC ATC ACT CTC GAC CAA TCA CCC CGG CTC GAG TGG	90
	Lys his Tyr Gly Ile Thr Leu Asp Gln Ser Ala Arg Leu Glu Trp	
	20 30	
91	CCG GCA CTG ATC GAC GGA GCA CTG GCG TCC TAC GAC GTC GTC GAC	135
	Pro Ala Leu Ile Asp Gly Ala Leu Gly Ser Tyr Asp Val Val Asp	
	40	
136	CAG TTG TAC GCC GAC GAG GCA ACC CCG CCG ACC ACG TCA CGT GAG	180
	Gln Leu Tyr Ala Asp Glu Ala Thr Pro Pro Thr Thr Ser Arg Glu	
	50 60	
181	CAC ACG GTC CCA ACA GCG AGC GAA AAT CCT TTG AGC GCT TGG TAT	225
	His Thr Val Pro Thr Ala Ser Glu Asn Pro Leu Ser Ala Trp Tyr	
	70	
226	GTG ACC ACA AGC ATC CCG CCG ACG TCG GAC GGC GTC CTG ACC GCC	270
	Val Thr Thr Ser Ile Pro Pro Thr Ser Asp Gly Val Leu Thr Gly	
	80 90	
271	CGA CCC GTG GCG ATC AAG GCA AAC GTG ACC GTG CCC GGA GTT CCG	315
	Arg Arg Val Ala Ile Lys Asp Asn Val Thr Val Ala Gly Val Pro	
	100	
316	ATG ATG AAC GCG TCT CCG ACA GTA GAG GCG TTC ACT CCG TCT CCG	360
	Mec Met Asn Gly Ser Arg Thr Val Glu Gly Phe Thr Pro Ser Arg	
	110 120	

9	10
361 GAC GCG ACT GTG ATC ACT CGA CTA CTG GCG GCC GGT GCA ACC GTC Asp Ala Thr Val Ile Thr Arg Leu Leu Ala Ala Gly Ala Thr Val	405
130	
406 GCG GCC AAA GCT GTG TGT GAG GAC CTG TGT TTC TCC GGT TCG AGC Ala Gly Lys Ala Val Cys Glu Asp Leu Cys Phe Ser Gly Ser Ser	450
140	150
451 TTC ACA CCG GCA AGC CGA CCG GTC CGC AAT CCA TCG GAC CCA CAG Phe Thr Pro Ala Ser Gly Pro Val Arg Asn Pro Trp Asp Pro Gln	495
160	
496 CGT GAA GCA GGT CGA TCA TCC GGT GGC AGT GCG GCT CTC GTC GCA Arg Glu Ala Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Ala Leu Val Ala	540
170	180
541 AAC GGT GAC GTC GAT TTT GCG ATC GCG GCG GAT CAG GGT GGA TCG Asn Gly Asp Val Asp Phe Ala Ile Gly Gly Asp Gln Gly Gly Ser	585
190	
586 ATC CCG ATC CCG GCG GCA TTC TGC GCG GTC GTC GGA CAC AAG CCG Ile Arg Ile Pro Ala Ala Phe Cys Gly Val Val Gly His Lys Pro	630
200	210
631 ACG TTC GCG CTC GTC CCG TAT ACC GGT GCA TTT CCC ATC GAG CGA Thr Phe Gly Leu Val Pro Tyr Thr Gly Ala Phe Pro Ile Glu Arg	675
220	
676 ACA ATC GAC CAT CTC GCG CCG ATC ACA CCG ACG GTC CAC GAT GCC Thr Ile Asp His Leu Gly Pro Ile Thr Arg Thr Val His Asp Ala	720
230	240
721 GCA CTG ATG CTC TCG GTC ATC GCC GGT CCG GAC GGT AAC GAC CCA Ala Leu Met Leu Ser Val Ile Ala Gly Arg Asp Gly Asn Asp Pro	765
250	
766 GCG CAA GCG GAC AGC GTC GAA GCA GGT GAC TAT CTG TCC ACC CTC Arg Gln Ala Asp Ser Val Glu Ala Gly Asp Tyr Leu Ser Thr Leu	810
260	270
811 GAC TCC GAT GTG GAT GGT CTG CGA ATC GCG ATC GTT CGA GAA GGT Asp Ser Asp Val Asp Gly Leu Arg Ile Gly Ile Val Arg Glu Gly	855
280	
856 TTC GCG CAC GCG GTC TCA CAG CCC GAG GTC GAC GAC GCA GTC CCG Phe Gly His Ala Val Ser Gln Pro Glu Val Asp Asp Ala Val Arg	900
290	300
901 GCA GCG GCA CAC AGT CTG TCC GAA ATC GGT TGC ACG GTA GAG GAA Ala Ala Ala His Ser Leu Ser Glu Ile Gly Cys Thr Val Glu Glu	945
310	
946 GTA AAC ATC CCG TGG CAC CTA CAT GCT TTC CAC ATC TGG AAC GTG Val Asn Ile Pro Trp His Leu His Ala Phe His Ile Trp Asn Val	990
320	330
991 ATC GCG ACG GAC GGT GGT GCC TAC CAG ATG TTG GAC GCG AAC GGA Ile Ala Thr Asp Gly Gly Ala Tyr Gln Met Leu Asp Gly Asn Gly	1035
340	
1036 TAC GCG ATG AAC GCC GAA GGT TTG TAC GAT CCG GAA GTG ACG GCA Tyr Gly Met Asn Ala Glu Gly Leu Tyr Asp Pro Glu Val Thr Ala	1080
350	360
1081 CAC TTT GCT TCT CGA GCG CTT CAG CAC GCG GAC GCT CTG TCC GAA His Phe Ala Ser Arg Arg Leu Gln His Ala Asp Ala Leu Ser Glu	1125

1126 ACC GTC AAA CTG GTG GCT CTG ACC GCC CAC CAC GCC ATC ACC ACC 1170
 Thr Val Lys Leu Val Ala Leu Thr Gly His His Gly Ile Thr Thr
 380 390

1171 CTC GCC GCC CCG AGC TAC GCC AAA GCC CCG AAC CTC GTA CCG CTC 1215
 Leu Gly Gly Ala Ser Tyr Gly Lys Ala Arg Asn Leu Val Pro Leu
 400

1216 GCC GCC GCC GCC TAC GAC ACT GCC TTG AGA CAA TTC GAC GTC CTG 1260
 Ala Arg Ala Ala Tyr Asp Thr Ala Leu Arg Gln Phe Asp Val Leu
 410 420

1261 GTG ATG CCC ACA CTG CCC TAC GTC GCA TCC GAA CTA CCG GCG AAG 1305
 Val Met Pro Thr Leu Pro Tyr Val Ala Ser Glu Leu Pro Ala Lys
 430

1306 GAC GTG GAT CGT GCA ACC TTC ATC ACG AAG CCT CTC GCG ATG ATC 1350
 Asp Val Asp Arg Ala Thr Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Met Ile
 440 450

1351 GCC AAC ACA GCA CCG TTC GAC GTG ACC GGA CAT CCG TCC CTG TCC 1395
 Ala Asn Thr Ala Pro Phe Asp Val Thr Gly His Pro Ser Leu Ser
 460

1396 GTT CCC GCC GGC CTG GTG AAC GCG CTT CCG GTC GGA ATG ATG ATC 1440
 Val Pro Ala Gly Leu Val Asn Gly Leu Pro Val Gly Met Met Ile
 470 480

1441 ACC GCC AAG ACC TTC GAC GAT GCG ACG GTC CTC CCG GTC GCG CCG 1485
 Thr Gly Lys Thr Phe Asp Asp Ala Thr Val Leu Arg Val Gly Arg
 490

1486 GCA TTC GAA AAG CTT CCG GCC GCG TTT CCG ACG CCT GCC GAC CAC 1530
 Ala Phe Glu Lys Leu Arg Gly Ala Phe Pro Thr Pro Ala Asp His
 500 510

1531 ATC TCC GAC TCT GCA CCA CAA CTC AGC CTC ACC TAG 1566
 Ile Ser Asp Ser Ala Pro Gln Leu Ser Leu Thr ***
 520

配列番号: 2

配列の長さ: 1289

配列の型: 核酸

鎖の数: 2本鎖

トポロジー: 直鎖

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: ロードコッカス ロードクラス (Rhodococcus rhodochrous) 40 *

*株名: IFO15564

配列の特徴

配列の産物: ニトリルヒドラターゼ α サブユニット

存在位置: 1...624

特徴を決定した方法: E

配列の産物: ニトリルヒドラターゼ β サブユニット

存在位置: 651...1289

特徴を決定した方法: E

1 ATG TCA GTA ACG ATC GAC CAC ACA ACG GAG AAC GCC GCA CCG GCC 45
 Met Ser Val Thr Ile Asp His Thr Thr Glu Asn Ala Ala Pro Ala
 10

46 CAG GCG CCG GTC TCC GAT CCG GCG TGG CCG CTG TTC CCG GCA CTC 90
 Gln Gly Pro Val Ser Asp Arg Ala Trp Ala Leu Phe Arg Ala Leu
 20 30

91 GAC GGT AAG GGA TTG GTA CCC GAC GGT TAC GTC GAG GGA TGG AAG 135
 Asp Gly Lys Gly Leu Val Pro Asp Gly Tyr Val Glu Gly Trp Lys
 40

13	14
136 AAG ACC TTC GAG GAG GAC TTC AGT CCA AGG CGC GGA GCG GAA TTG	180
Lys Thr Phe Glu Glu Asp Phe Ser Pro Arg Arg Gly Ala Glu Leu	
50	60
181 GTC CGC CGG CCT TGG ACC GAC CCC GAT TTC CCG CAA CTG CTT CTC	225
Val Ala Arg Ala Trp Thr Asp Pro Asp Phe Arg Gln Leu Leu Leu	
70	
226 ACC GAC GGT ACC GCC CGC GTT GCC CAG TAC GGA TAT CTT GGC CCC	270
Thr Asp Gly Thr Ala Ala Val Ala Gln Tyr Gly Tyr Leu Gly Pro	
80	90
271 CAG GGC GAA TAC ATC GTG GCA GTC GAA GAC ACC CGC ACC CTC AAG	315
Gln Gly Glu Tyr Ile Val Ala Val Glu Asp Thr Pro Thr Leu Lys	
100	
316 AAC GTG ATC GTG TGC TCG CTG TGT TCA TGC ACC GCG TGG CCC ATT	360
Asn Val Ile Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr Ala Trp Pro Ile	
110	120
361 CTC GGC CTG CCC CCT ACC TGG TAC AAG AGT TTC GAA TAC CGT CGC	405
Leu Gly Leu Pro Pro Thr Trp Tyr Lys Ser Phe Glu Tyr Arg Ala	
130	
406 CGA GTG GTG CGT GAG CCA CGG AAG GTT CTC TCC GAG ATC GGA ACC	450
Arg Val Val Arg Glu Pro Arg Lys Val Leu Ser Glu Met Gly Thr	
140	150
451 GAG ATC CGC TCG GAC GTC GAG ATC CGC GTC TAC GAC ACC ACC GCC	495
Glu Ile Ala Ser Asp Val Glu Ile Arg Val Tyr Asp Thr Thr Ala	
160	
496 GAA ACT CGC TAC ATG GTT CTC CGC CAA CGT CCC GCA GGC ACC GAA	540
Glu Thr Arg Tyr Met Val Leu Pro Gln Arg Pro Ala Gly Thr Glu	
170	180
541 GGC TGG AGC CAG GAA CAG CTT CAA GAG ATC GTC ACC AAG GAC TGC	585
Gly Trp Ser Gln Glu Gln Leu Gln Glu Ile Val Thr Lys Asp Cys	
190	
586 CTG ATC GGC GTC GCA GTC CCG CAG GTC CCC ACC GTC TGA TCACCCCG	632
Leu Ile Gly Val Ala Val Pro Gln Val Pro Thr Val ***	
200	
633 AC AAGAAAGAAG CACACC ATG GAT GGA GTA CAC GAT CTT GCC GGA GTT	680
Met Asp Gly Val His Asp Leu Ala Gly Val	
10	
681 CAA GGC TTC GGC AAA GTC CCG CAT ACC GTC AAC GGC GAC ATC GGC	725
Gln Gly Phe Gly Lys Val Pro His Thr Val Asn Ala Asp Ile Gly	
20	
726 CCC ACC TTC CAC GCC GAG TGG GAA CAC CTG CCG TAC AGC CTG ATG	770
Pro Thr Phe His Ala Glu Trp Glu His Leu Pro Tyr Ser Leu Met	
30	40
771 TTC GCC GGT GTC GCC GAA CTC GCG GCA TTC AGC GTC GAC GAA GTT	815
Phe Ala Gly Val Ala Glu Leu Gly Ala Phe Ser Val Asp Glu Val	
50	
816 CGA TAC GTC GTC GAG CGG ATG GAA CCA CGC CAC TAC ATG ATG ACC	860
Arg Tyr Val Val Glu Arg Met Glu Pro Arg His Tyr Met Met Thr	
60	70
861 CCG TAC TAC GAG ACG TAC GTC ATC GGC GTC CCG ACG CTG ATG GTC	905

15 16
 Pro Tyr Tyr Glu Arg Tyr Val Ile Gly Val Ala Thr Leu Met Val
 80
 906 GAA AAG GGA ATC CTG ACG CAG GAA GAA CTC GAA ACC CTT GCA GCG 950
 Glu Lys Gly Ile Leu Thr Gln Glu Glu Leu Glu Ser Leu Ala Gly
 90 100
 951 GGA CCG TTC CCA CTG TCG CCG CCC AGC GAA TCC GAA GCG CGT CCG 995
 Gly Pro Phe Pro Leu Ser Arg Pro Ser Glu Ser Glu Gly Arg Pro
 110
 996 GCA CCC GTC GAG ACG ACC ACC TTC GAA ATC GGT CAG CGT GTA CGC 1040
 Ala Pro Val Glu Thr Thr Thr Phe Glu Ile Gly Gln Arg Val Arg
 120 130
 1041 GTG CCG GAC GAG TAC GTT CCG GGG CAT ATT CGA ATG CCT GCG TAC 1085
 Val Arg Asp Glu Tyr Val Pro Gly His Ile Arg Met Pro Ala Tyr
 140
 1086 TGC CCG GGA CGA GTG GGA ACC ATC TCT CAT CCG ACT ACC GAG AAG 1130
 Cys Arg Gly Arg Val Gly Thr Ile Ser His Arg Thr Ser Glu Lys
 150 160
 1131 TGG CCG TTT CCC GAC GCA ATT GGC CAC GGG CCG AAC GAC GCC GCG 1175
 Trp Pro Phe Pro Asp Ala Ile Gly His Gly Arg Asn Asp Ala Gly
 170
 1176 GAA GAA CCG ACG TAC CAC GTG AAG TTC GCC GCC GAG GAA TTG TTC 1220
 Glu Glu Pro Thr Tyr His Val Lys Phe Ala Ala Glu Glu Leu Phe
 180 190
 1221 GGT ACC GAC ACC GAC GCC GCC ACC GTC GTA GTC GAC CTC TTC GAG 1265
 Gly Ser Asp Thr Asp Gly Gly Ser Val Val Val Asp Leu Phe Glu
 200
 1266 GGT TAC CTC GAG CCT GCG GCC TGA 1289
 Gly Tyr Leu Glu Pro Ala Ala ***
 210

配列番号: 3

配列の長さ: 4775

配列の型: 核酸

鎖の数: 2本鎖

トポロジー: 直鎖

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: ロードコッカス ロードクラス (Rhodococcus rhodochrous)

株名: IF015564

クローン名: pCNH-SE

配列の特徴

特徴を表す記号: RBS

存在位置: 330..334

特徴を決定した方法: E

配列の産物: アミダーゼ

存在位置: 345..1910

特徴を決定した方法: E

特徴を表す記号: RBS

30* 存在位置: 1973..1977

特徴を決定した方法: E

配列の産物: ニトリルヒドラターゼαサブユニット

存在位置: 1984..2607

特徴を決定した方法: E

特徴を表す記号: RBS

存在位置: 2622..2627

特徴を決定した方法: E

配列の産物: ニトリルヒドラターゼβサブユニット

存在位置: 2634..4570

40 特徴を決定した方法: E

特徴を表す記号: terminator

存在位置: 3288..3329

特徴を決定した方法: E

配列の種類: ハイボセティカル

: Yes

存在位置: 3371..4570

特徴を決定した方法: E

*

1 GAGCTCGAAC GAACCTCTGC CTCGGCTCAG TTCCCTGTGG GAGACAACGT ACGAA 55
 56 CGGATCGTCACTTA CGCACCGGCC GTGCAACGAA CGTCCGACGG CGATCCGGAA 110

17	18
111 ACAGTACTTCGGCAGCTTGT CACGACGTGG AAAAGCTCTA CGAACAAACGG CGTTCC	166
167 ACTG CATCGACCGATTCTGCTCGC TGAATCACGC CGTGGCGCGC TGTACCCCGG T	221
222 TCTCTCTGA CCGCGCGTAACCCGAACCTA ACGAGTCAAT ATGTCGATAC CTATTGA	277
278 CGC AATTATGGAT CCGGCCCTAGTCTGAAAGAC AAGTGAAGCC GATCACATCA GG	332
333 AGCACACT TCTC ATG GCG ACA ATC CGA CCT GAC GAC AAT CCA ATA	377
Met Ala Thr Ile Arg Pro Asp Asp Asn Ala Ile	
10	
378 GAC ACC GCC GCA AAG CAT TAC GGC ATC ACT CTC GAC CAA TCA GCC	422
Asp Thr Ala Ala Lys His Tyr Gly Ile Thr Leu Asp Gln Ser Ala	
20	
423 CGG CTC GAG TGG CCG GCA CTG ATC GAC GGA GCA CTG GGC TCC TAC	467
Arg Leu Glu Trp Pro Ala Leu Ile Asp Gly Ala Leu Gly Ser Tyr	
30 40	
468 GAC GTC GTC GAC CAG TTG TAC GCC GAC GAG GCA ACC CCG CCG ACC	512
Asp Val Val Asp Gln Leu Tyr Ala Asp Glu Ala Thr Pro Pro Thr	
50	
513 ACG TCA CGT GAG CAC ACG GTG CCA ACA GCG AGC GAA AAT CCT TTG	557
Thr Ser Arg Glu His Thr Val Pro Thr Ala Ser Glu Asn Pro Leu	
60 70	
558 AGC GCT TGG TAT GTG ACC ACA AGC ATC CCG CCG ACG TCG GAC GGC	602
Ser Ala Trp Tyr Val Thr Thr Ser Ile Pro Pro Thr Ser Asp Gly	
80	
603 GTC CTG ACC GGC CGA CCG GTG CCG ATC AAG GAC AAC GTG ACC GTG	647
Val Leu Thr Gly Arg Arg Val Ala Ile Lys Asp Asn Val Thr Val	
90 100	
648 GCC GGA GTT CCG ATG ATG AAC GCG TCT CCG ACA GTA GAG GCG TTC	692
Ala Gly Val Pro Met Met Asn Gly Ser Arg Thr Val Glu Gly Phe	
110	
693 ACT CCG TCT CGC GAC CCG ACT GTG ATC ACT CGA CTA CTG GCG GCC	737
Thr Pro Ser Arg Asp Ala Thr Val Ile Thr Arg Leu Leu Ala Ala	
120 130	
738 GGT GCA ACC GTC CCG GGC AAA GCT GTG TGT GAG GAC CTG TGT TTC	782
Gly Ala Thr Val Ala Gly Lys Ala Val Cys Glu Asp Leu Cys Phe	
140	
783 TCC GGT TCG AGC TTC ACA CCG GCA AGC GGA CCG GTC CCG AAT CCA	827
Ser Gly Ser Ser Phe Thr Pro Ala Ser Gly Pro Val Arg Asn Pro	
150 160	
828 TGG GAC CCA CAG CGT GAA GCA GGT GGA TCA TCC GGT GGC AGT GCG	872
Trp Asp Pro Gln Arg Glu Ala Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala	
170	
873 GCT CTC GTC GCA AAC GGT GAC GTC GAT TTT GCC ATC GGC GCG GAT	917
Ala Leu Val Ala Asn Gly Asp Val Asp Phe Ala Ile Gly Gly Asp	
180 190	
918 CAG GGT GGA TCG ATC CCG ATC CCG GCG GCA TTC TCG GCG GTC GTC	962
Gln Gly Gly Ser Ile Arg Ile Pro Ala Ala Phe Cys Gly Val Val	
200	
963 GGA CAC AAG CCG ACG TTC GCG CTC GTC CCG TAT ACC GGT GCA TTT	1007
Gly His Lys Pro Thr Phe Gly Leu Val Pro Tyr Thr Gly Ala Phe	
210 220	

19		20
1008	CCC ATC GAG CGA ACA ATC GAC CAT CTC GGC CCG ATC ACA CGC ACG Pro Ile Glu Arg Thr Ile Asp His Leu Gly Pro Ile Thr Arg Thr	1052
	230	
1053	GTC CAC GAT GCC GCA CTG ATG CTC TCG GTC ATC GCC GGT CGC GAC Val His Asp Ala Ala Leu Met Leu Ser Val Ile Ala Gly Arg Asp	1097
	240 250	
1098	GGT AAC GAC CCA CGC CAA GCC GAC AGC GTC GAA GCA GGT GAC TAT Gly Asn Asp Pro Arg Gln Ala Asp Ser Val Glu Ala Gly Asp Tyr	1142
	260	
1143	CTG TCC ACC CTC GAC TCC GAT GTG GAT GGT CTG CGA ATC GGG ATC Leu Ser Thr Leu Asp Ser Asp Val Asp Gly Leu Arg Ile Gly Ile	1187
	270 280	
1188	GTT CGA GAA GGT TTC GCG CAC GCG GTC TCA CAG CCC GAG GTC GAC Val Arg Glu Gly Phe Gly His Ala Val Ser Gln Pro Glu Val Asp	1232
	290	
1233	GAC GCA GTC CGC GCA GCG GCA CAC AGT CTG TCC GAA ATC GGT TGC Asp Ala Val Arg Ala Ala Ala His Ser Leu Ser Glu Ile Gly Cys	1277
	300 310	
1278	ACG GTA GAG GAA GTA AAC ATC CCG TGG CAC CTA CAT GCT TTC CAC Thr Val Glu Glu Val Asn Ile Pro Trp His Leu His Ala Phe His	1322
	320	
1323	ATC TCG AAC GTG ATC CCC ACG GAC GGT GGT CCC TAC CAG ATG TTG Ile Trp Asn Val Ile Ala Thr Asp Gly Gly Ala Tyr Gln Met Leu	1367
	330 340	
1368	GAC GCC AAC GGA TAC GGC ATG AAC GCC GAA GGT TTG TAC GAT CCG Asp Gly Asn Gly Tyr Gly Met Asn Ala Glu Gly Leu Tyr Asp Pro	1412
	350	
	Glu Val Thr Ala His Phe Ala Ser Arg Arg Leu Gln His Ala Asp	
	360 370	
1458	GCT CTG TCC GAA ACC GTC AAA CTG GTG GCT CTG ACC GGC CAC CAC Ala Leu Ser Glu Thr Val Lys Leu Val Ala Leu Thr Gly His His	1502
	380	
1503	GGC ATC ACC ACC CTC GGC GGC GCG AGC TAC GGC AAA GCC CGG AAC Gly Ile Thr Thr Leu Gly Gly Ala Ser Tyr Gly Lys Ala Arg Asn	1547
	390 400	
1548	CTC GTA CCG CTC GCC CGC GCC GCC TAC GAC ACT GCC TTG AGA CAA Leu Val Pro Leu Ala Arg Ala Ala Tyr Asp Thr Ala Leu Arg Gln	1592
	410	
1593	TTC GAC GTC CTG GTG ATG CCC ACA CTG CCC TAC GTC GCA TCC GAA Phe Asp Val Leu Val Met Pro Thr Leu Pro Tyr Val Ala Ser Glu	1637
	420 430	
1638	CTA CCG GCG AAG GAC GTG GAT CGT GCA ACC TTC ATC ACG AAG GCT Leu Pro Ala Lys Asp Val Asp Arg Ala Thr Phe Ile Thr Lys Ala	1682
	440	
1683	CTC GCG ATG ATC GCC AAC ACA GCA CCG TTC GAC GTG ACC GGA CAT Leu Gly Met Ile Ala Asn Thr Ala Pro Phe Asp Val Thr Gly His	1727
	450 460	
1728	CCG TCC CTG TCC GTT CCC GCC GGC CTG GTG AAC GCG CTT CCG GTC Pro Ser Leu Ser Val Pro Ala Gly Leu Val Asn Gly Leu Pro Val	1772
	470	

21		22
1773	GGA ATG ATG ATC ACC GGC AAG ACC TTC GAC CAT GCG ACG GTC CTC Gly Met Met Ile Thr Gly Lys Thr Phe Asp Asp Ala Thr Val Leu 480 490	1817
1818	CGG GTC GCG CGC GCA TTC GAA AAG CTT CGC GCG GCG TTT CCG ACG Arg Val Gly Arg Ala Phe Glu Lys Leu Arg Gly Ala Phe Pro Thr 500	1862
1863	CCT GCC GAC CAC ATC TCC GAC TCT GCA CCA CAA CTC AGC CTC ACC Pro Ala Asp His Ile Ser Asp Ser Ala Pro Gln Leu Ser Leu Thr 510 520	1907
1908	TAG TTCTGTATCC GCACTTGAC AACAAATTCC ACCGATTAC ACATGATCAG C ***	1961
1962	CCGCATAGA AAAGGTGAAC CAG ATG TCA GTA ACG ATC GAC CAC ACA ACG Met Ser Val Thr Ile Asp His Thr Thr	2010
2011	GAG AAC GCC GCA CCG GCC CAG GCG CCG GTC TCC GAT CCG GCG TGG Glu Asn Ala Ala Pro Ala Gln Gly Pro Val Ser Asp Arg Ala Trp 10 20	2055
2056	GCC CTG TTC CGC GCA CTC GAC GGT AAG GGA TTG GTA CCC GAC GGT Ala Leu Phe Arg Ala Leu Asp Gly Lys Gly Leu Val Pro Asp Gly 30	2100
2101	TAC GTC GAG GGA TGG AAG ACC TTC GAG GAG GAC TTC AGT CCA Tyr Val Glu Gly Trp Lys Lys Thr Phe Glu Glu Asp Phe Ser Pro 40 50	2145
2146	AGG CGC GGA GCG GAA TTG GTC GCG CCG GCT TGG ACC GAC CCC GAT Arg Arg Gly Ala Glu Leu Val Ala Arg Ala Trp Thr Asp Pro Asp 60	2190
2191	TTC CCG CAA CTG CTT CTC ACC GAC GGT ACC GCC GCG GTT GCC CAG Phe Arg Gln Leu Leu Leu Thr Asp Gly Thr Ala Ala Val Ala Gln 70 80	2235
2236	TAC GGA TAT CTT GGC CCC CAG GGC GAA TAC ATC GTG GCA GTC GAA Tyr Gly Tyr Leu Gly Pro Gln Gly Glu Tyr Ile Val Ala Val Glu 90	2280
2281	GAC ACC CCG ACC CTC AAG AAC GTG ATC GTG TGC TGG CTG TGT TCA Asp Thr Pro Thr Leu Lys Asn Val Ile Val Cys Ser Leu Cys Ser 100 1100	2325
2326	TGC ACC GCG TGG CCC ATT CTC GGC CTG CCC CCT ACC TGG TAC AAG Cys Thr Ala Trp Pro Ile Leu Gly Leu Pro Pro Thr Trp Tyr Lys 120	2370
2371	AGT TTC GAA TAC CGT GCG CGA GTG GTG CGT GAG CCA CCG AAG GTT Ser Phe Glu Tyr Arg Ala Arg Val Val Arg Glu Pro Arg Lys Val 130 140	2415
2416	CTC TCC GAG ATG GGA ACC GAG ATC GCG TCG GAC GTC GAG ATC CGC Leu Ser Glu Met Gly Thr Glu Ile Ala Ser Asp Val Glu Ile Arg 150	2460
2461	GTC TAC GAC ACC ACC GCC GAA ACT CGC TAC ATG GTT CTC CCG CAA Val Tyr Asp Thr Thr Ala Glu Thr Arg Tyr Met Val Leu Pro Gln 160 170	2505
2506	CGT CCC GCA GGC ACC GAA GGC TGG AGC CAG GAA CAG CTT CAA GAG Arg Pro Ala Gly Thr Glu Gly Trp Ser Gln Glu Gln Leu Gln Glu 180	2550
2551	ATC GTC ACC AAG GAC TGC CTG ATC GGC GTC GCA GTC CCG CAG GTC	2595

23	Ile Val Thr Lys Asp Cys Leu Ile Gly Val Ala Val Pro Gln Val	24
190	200	
2596	CCC ACC GTC TGA TCACCCGACA AGAAAGAAGC ACACC ATG GAT GGA	2642
	Pro Thr Val *** Met Asp Gly	
2643	GTA CAC GAT CTT GCC GGA GTT CAA GGC TTC GGC AAA GTC CCG CAT	2687
	Val His Asp Leu Ala Gly Val Gln Gly Phe Gly Lys Val Pro His	
	10	
2688	ACC GTC AAC GCC GAC ATC GGC CCC ACC TTC CAC GCC GAG TGG GAA	2732
	Thr Val Asn Ala Asp Ile Gly Pro Thr Phe His Ala Glu Trp Glu	
	20 30	
2733	CAC CTG CCG TAC AGC CTG ATG TTC GCC GGT GTC GCC GAA CTC GGG	2777
	His Leu Pro Tyr Ser Leu Met Phe Ala Gly Val Ala Glu Leu Gly	
	40	
2778	GCA TTC AGC GTC GAC GAA GTT CGA TAC GTC GTC GAG CGG ATG GAA	2822
	Ala Phe Ser Val Asp Glu Val Arg Tyr Val Val Glu Arg Met Glu	
	50 60	
2823	CCA CCG CAC TAC ATG ATG ACC CCG TAC TAC GAG AGG TAC GTC ATC	2867
	Pro Arg His Tyr Met Met Thr Pro Tyr Tyr Glu Arg Tyr Val Ile	
	70	
2868	GGC GTC CCG ACG CTG ATG GTC GAA AAG GGA ATC CTG ACG CAG GAA	2912
	Gly Val Ala Thr Leu Met Val Glu Lys Gly Ile Leu Thr Gln Glu	
	80 90	
2913	GAA CTC GAA AGC CTT GCA GCG GGA CCG TTC CCA CTG TCG CCG CCC	2957
	Glu Leu Glu Ser Leu Ala Gly Gly Pro Phe Pro Leu Ser Arg Pro	
	100	
2958	AGC GAA TCC GAA GCG CGT CCG GCA CCC GTC GAG ACG ACC ACC TTC	3002
	Ser Glu Ser Glu Gly Arg Pro Ala Pro Val Glu Thr Thr Thr Phe	
	110 120	
3003	GAA ATC GGT CAG CGT GTA CCG GTG CCG GAC GAG TAC GTT CCG GCG	3047
	Glu Ile Gly Gln Arg Val Arg Val Arg Asp Glu Tyr Val Pro Gly	
	130	
3048	CAT ATT CGA ATG CCT GCG TAC TCC CCG GGA CGA GTG GGA ACC ATC	3092
	His Ile Arg Met Pro Ala Tyr Cys Arg Gly Arg Val Gly Thr Ile	
	140 150	
3093	TCT CAT CCG ACT AGC GAG AAG TGG CCG TTT CCC GAC GCA ATT GGC	3137
	Ser His Arg Thr Ser Glu Lys Trp Pro Phe Pro Asp Ala Ile Gly	
	160	
3138	CAC GCG CCG AAC GAC GCC GCG GAA GAA CCG ACG TAC CAC GTG AAG	3182
	His Gly Arg Asn Asp Ala Gly Glu Glu Pro Thr Tyr His Val Lys	
	170 180	
3183	TTC GCC GCC GAG GAA TTG TTC GGT AGC GAC ACC GAC GCG GCG AGC	3227
	Phe Ala Ala Glu Glu Leu Phe Gly Ser Asp Thr Asp Gly Gly Ser	
	190	
3228	GTC GTA GTC GAC CTC TTC GAG GGT TAC CTC GAG CCT GCG GCC TGA	3272
	Val Val Val Asp Leu Phe Glu Gly Tyr Leu Glu Pro Ala Ala ***	
	200 210	
3273	TCGTCAACA TTCGGGCGG CGGTACCGG ATCACAGGT TTCGCGTGAC GCGCG	3327
3328	CCTGA TCACACCAAT TCTCTCATTG GGAAGGACAC TGGAAATC ATG GTC GAC	3379
	Met Val Asp	
3380	ACA CGA CTT CCG GTC ACG GTG CTG TCA GGT TTC CTG GCG GCC GGG	3424

25	Thr Arg Leu Pro Val Thr Val Leu Ser Gly Phe Leu Gly Ala Gly	26
	10	
3425	AAG ACG ACA CTA CTC AAC GAG ATC CTG CGA AAT CCG GAG GCC CGC	3469
	Lys Thr Thr Leu Leu Asn Glu Ile Leu Arg Asn Arg Glu Gly Arg	
	20 30	
3470	CGG GTT GCG GTG ATC GTC AAC GAC ATG ACC GAA ATC AAC ATC GAC	3514
	Arg Val Ala Val Ile Val Asn Asp Met Ser Glu Ile Asn Ile Asp	
	40	
3515	AGT GCA GAA GTC GAG CGT GAG ATC TCG CTC AGT CCG TCC GAG GAG	3559
	Ser Ala Glu Val Glu Arg Glu Ile Ser Leu Ser Arg Ser Glu Glu	
	50 60	
3560	AAA CTG GTC GAG ATG ACC AAC GCG TGC ATC TGC TCC ACT CTG CGA	3604
	Lys Leu Val Glu Met Thr Asn Gly Cys Ile Cys Cys Thr Leu Arg	
	70	
3605	GAG GAT CTT CTC TCC GAG ATC AGT GCC TTG GCC GCC GAT GCC CGA	3649
	Glu Asp Leu Leu Ser Glu Ile Ser Ala Leu Ala Ala Asp Gly Arg	
	80 90	
3650	TTC GAC TAC CTA CTC ATC GAA TCT TCG GCG ATC TCC GAA CCG CTT	3694
	Phe Asp Tyr Leu Leu Ile Glu Ser Ser Gly Ile Ser Glu Pro Leu	
	100	
3695	CCC GTC GCA GAG ACG TTC ACA TTC ATC GAT ACC GAC GCC CAC GCC	3739
	Pro Val Ala Glu Thr Phe Thr Phe Ile Asp Thr Asp Gly His Ala	
	110 120	
3740	CTC GCC GAC GTC GCC CGA CTC GAC ACC ATG GTC ACC GTC GTC GAC	3784
	Leu Ala Asp Val Ala Arg Leu Asp Thr Met Val Thr Val Val Asp	
	130	
3785	GCC CAC AGT TTT CTG CCG GAC TAC ACG GCT GCG GCC CGC GTC GAA	3829
	Gly His Ser Phe Leu Arg Asp Tyr Thr Ala Gly Gly Arg Val Glu	
	140 150	
3830	GCC GAT GCC CCG GAA GAC GAA CGA GAC ATC CCG GAT CTG CTT GTC	3847
	Ala Asp Ala Pro Glu Asp Glu Arg Asp Ile Ala Asp Leu Leu Val	
	160	
3875	GAT CAG ATC GAA TTT GCC GAC GTC ATC CTG GTG ACC AAG GCC GAT	3919
	Asp Gln Ile Glu Phe Ala Asp Val Ile Leu Val Ser Lys Ala Asp	
	170 180	
3920	CTC GTC TCG CAC CAG CAC CTG GTC GAA TTG ACC GCA GTC CTG CCG	3964
	Leu Val Ser His Gln His Leu Val Glu Leu Thr Ala Val Leu Arg	
	190	
3965	TCT TTG AAC GCA TCC GCT GCG ATA GTT CCG ATG ACG CTC GGT CCG	4009
	Ser Leu Asn Ala Ser Ala Ala Ile Val Pro Met Thr Leu Gly Arg	
	200 210	
4010	ATC CCA CTC GAC ACG ATT CTC GAC ACC GGT TTG TTC TCA CTC GAA	4054
	Ile Pro Leu Asp Thr Ile Leu Asp Thr Gly Leu Phe Ser Leu Glu	
	220	
4055	AAG GCT GCA CAG GCC CCC GGA TGG TTA CAA GAA CTC CAA GGT GAA	4099
	Lys Ala Ala Gln Ala Pro Gly Trp Leu Gln Glu Leu Gln Gly Glu	
	230 240	
4100	CAC ATC CCC GAA ACC GAG GAG TAC GGA ATC GGT TCG GTG GTG TAC	4144
	His Ile Pro Glu Thr Glu Glu Tyr Gly Ile Gly Ser Val Val Tyr	

27	250	28
4145	CCC GAG CGC GCA CCC TTC CAC CCC CAA CGG CTG CAT GAT TTC CTC	4189
	Arg Glu Arg Ala Pro Phe His Pro Gln Arg Leu His Asp Phe Leu	
	260	270
4190	ACC ACC GAG TGG ACC AAC GGA AAG TTA CTT CGG GCC AAG GCC TAC	4234
	Ser Ser Glu Trp Thr Asn Gly Lys Leu Leu Arg Ala Lys Gly Tyr	
	280	
4235	TAC TCG AAT CCC GGC CGG TTC ACC GAG ATC CGG AGT ATT TCT CAG	4279
	Tyr Trp Asn Ala Gly Arg Phe Thr Glu Ile Gly Ser Ile Ser Gln	
	290	300
4280	GCC GGT CAT CTC ATT CGC CAC GGA TAC GTC GGC CGT TGG TGG AAC	4324
	Ala Gly His Leu Ile Arg His Gly Tyr Val Gly Arg Trp Trp Asn	
	310	
4325	TTT CTA CCC CGT GAC GAG TGG CCG GCC GAC GAT TAC CGT CGT GAC	4369
	Phe Leu Pro Arg Asp Glu Trp Pro Ala Asp Asp Tyr Arg Arg Asp	
	320	330
4370	GGA ATC CTC GAC AAG TGG GAA GAA CCC GTC CGA GAC TGC CGA CAA	4414
	Gly Ile Leu Asp Lys Trp Glu Glu Pro Val Gly Asp Cys Arg Gln	
	340	
4415	GAA CTC GTC TTC ATC GGC CAA GCC ATC GAC CCG TCT CGA CTG CAC	4459
	Glu Leu Val Phe Ile Gly Gln Ala Ile Asp Pro Ser Arg Leu His	
	350	360
4460	CGA GAA CTC GAC GCG TGT CTA CTC ACC ACA GCC GAG ATC GAA CTC	4504
	Arg Glu Leu Asp Ala Cys Leu Leu Thr Thr Ala Glu Ile Glu Leu	
	370	
4505	GGG CCA GAC GTG TGG ACC ACC TGG AGC GAC CCC CTG GCC GTC GCC	4549
	Gly Pro Asp Val Trp Thr Thr Trp Ser Asp Pro Leu Gly Val Gly	
	380	390
4550	TAT ACC GAC CAG ACC GTT TGA TATTGGTCCGG TTTGCCGTAA GTTGTCCGC	4600
	Tyr Thr Asp Gln Thr Val ***	
4601	A ATGGGGGTAT CACGCAACCG AACTCGGGCG TTGTTGATCG TCGCGCGGAT CGC	4654
4655	AGCCGGG ACCGTGGCCG CAGCTACGCC GCGGGGGGCC ACCTGACAG TCGGGCCG	4709
4710	AT GTCCGGCGAG TGGCGGGTCG AAACCGTAGC GCAACGGTTG GAACAGCTCG AA	4763
4764	AACCTCGA GCCC	4775

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はアミダーゼ遺伝子のPCRクローニングのために選んだアミノ酸配列と対応するDNA配列に基づいて作製した混合プライマーを示す。

【図2】図2はブラックハイブリダイゼーションで陽性

シグナルを示した組換えEMBL3ファージクローンの中、約9 kbのEcoRI DNA断片を有するもの、および組換え体プラスミドpCNH-SEの制限酵素地図を示す。

